

大腸癌発生増殖に及ぼす胆汁酸の影響に関する実験的研究

— 内的環境としての胆汁中胆汁酸組成の変化について —

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任：宮崎逸夫教授)

小 森 和 俊

(昭和60年5月7日受付)

本研究は大腸癌発生増殖過程における内的環境としての胆汁中胆汁酸組成の変化を究明することを目的とした。作用機序ならびに投与経路の異なる2種の発癌物質、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) および1,2-ジメチルヒドラジン (1,2-dimethylhydrazine, DMH) で誘発された大腸癌担癌ラットでの胆汁中胆汁酸組成を分析し、さらにこれらの発癌物質投与後における経時的な胆汁酸組成の推移を病理組織学的所見と対比検討した。また臨床的に大腸癌患者における胆嚢胆汁中胆汁酸組成についても検索した。その結果、MNNG誘発大腸癌の胆汁酸組成比はコール酸 (cholic acid, CA) の上昇、未同定胆汁酸 X の減少、1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値および CA/DCA (デオキシコール酸, deoxycholic acid) 値の上昇を示し、DMH誘発大腸癌では CA の上昇、ケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) および未同定胆汁酸 X の減少、1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値と CA/DCA 値の上昇と、ほぼ同様の組成比を示した。また、大腸癌患者の胆嚢胆汁中胆汁酸組成では CDCA の上昇、DCA の減少に加え、1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値と CA/DCA 値の上昇を認め、個体による胆汁酸代謝過程の相違から胆汁酸の種類は異っても、1次胆汁酸の上昇、2次胆汁酸の減少という点では一致した結果を示した。これらの胆汁酸組成の変化は、MNNG 注腸経過観察群では注腸後16週以降、DMH 皮下注経過観察群では総投与量 200 mg/kg のいずれも病理組織学的に腺腫性ポリープの出現する時期と一致してみられた。以上より、大腸癌担癌個体の胆汁では一定の胆汁酸組成比を示すことが判明し、しかも、この組成比の変化が大腸粘膜に腫瘍性変化の発生する時期と一致したことから、発癌物質で initiate された大腸粘膜自体の変化が閉鎖的な胆汁酸代謝に影響を及ぼし、大腸癌の発生増殖に対し促進的内的環境を形成するものと結論した。

Key words colon carcinoma, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 1,2-dimethylhydrazine, bile acid.

大腸癌の発生は種々の疫学的研究から個体の食生活と密接に関連することが指摘されている^{1)~5)}。すなわち、家族性ポリポージスなど一部の腸癌では遺伝的素因によってその発生が規定されているが⁶⁾、大部分の大腸癌は食餌に由来した外来性 noxa のみならず個体の内的環境の変化に基づき成立するものと言える。Sander ら⁷⁾は胃内で亜硝酸と二級アミンから発癌性を有するニトロソ化合物が生成されることを証明した

が、近年、大腸内においても腸内細菌叢の作用によって硝酸が亜硝酸に、アミノ酸から二級アミンが生成され、同様の物質が産生される可能性が指摘されている⁸⁾。これは個体が食生活を営む限り絶えず大腸癌発生に対し負荷状態にあることを意味する。ところで、欧米諸国での大腸癌罹患率がアジア、アフリカ諸国に比し高いことは周知の事実であり¹⁾³⁾⁹⁾、その要因として、食餌性因子、とくに高脂肪食摂取に基づく糞便中

Abbreviations: a.c., adenocarcinoma; CDCA, chenodeoxycholic acid; CA, cholic acid; DCA, deoxycholic acid; DMH, 1,2-dimethylhydrazine; LC, lithocholic acid; MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; pm, proper muscular layer; s, serosal layer; sm, submucosal layer; ss, subserosal layer; UDCA, ursodeoxycholic acid.

の胆汁酸組成の変化ならびに胆汁酸排泄量の増加が挙げられ、促進因子としての胆汁酸の重要性が指摘されている^{10)~12)}。Narisawa ら¹³⁾は化学発癌物質 N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) の水溶液注腸による実験大腸癌モデルを作製し、胆汁酸の経口投与を付加することによって、胆汁酸は発癌性を有しないが大腸癌発生に促進的作用を持つことを報告している。また、片山¹⁴⁾は人工肛門造設による便秘遮断大腸を作製し、この空置大腸に MNNG に加え各種胆汁酸の付加注腸投与を行い、1 次胆汁酸群に比し 2 次胆汁酸群で大腸癌発生率に有意の増加を認めたとし、2 次胆汁酸が促進的作用の主役を演じていると結論している。このように大腸癌発生上、胆汁酸、とくに 2 次胆汁酸の promotor としての役割には問題はないが、反面、胆汁酸代謝に影響の少ない低脂肪食状態でも少なからず大腸癌が発生したり¹⁵⁾、さらに、MNNG や 1,2 ジメチルヒドラジン (1,2-dimethylhydrazine, DMH) などの発癌物質単独投与によっても高率に大腸癌が発生する報告¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾もみられる。このことは、大腸内で生成された発癌性を有するニトロソ化合物や外来性の発癌物質自体、あるいはこれらの発癌物質で initiate された大腸粘膜動態の変化や腸内細菌叢の変化が、元来閉鎖的である胆汁酸代謝に影響を及ぼし、大腸癌発生に促進的内的環境を形成する可能性を推察させる。そこで、著者は臨床的ならびに実験的に大腸癌担癌生体における胆汁中胆汁酸組成の変化を検索するとともに、投与経路と作用機序の異った 2 種の発癌物質、MNNG および DMH による大腸癌発生過程での経時的な胆汁中胆汁酸組成の推移を検討した。その結果、大腸癌発生増殖に及ぼす胆汁酸の影響に関し興味ある知見を得たので報告する。

対象および方法

I. 実験動物

オリエンタル固型飼料および水道水で飼育した 250 g 前後の Wistar 系雄性ラットを用い、下記の処置をして実験モデルを作成した。

1. MNNG 注腸ラット

MNNG の投与方法は、蒸留水で溶解した 0.25% MNNG (和光純薬工業株式会社製) 液 1 ml をネラトンカテーテル (6 フレンチサイズ) でラット肛門より 8 日間連日注腸投与した。対照には生理食塩水を同様に注腸したラットを用いた。MNNG 誘発大腸癌担癌ラットにおける胆汁酸分析には、注腸後 40 週以上を経過したラットで大腸に癌腫を有するものを用い、対照ラットと比較検討した。さらに、経時的な胆管内胆汁

中胆汁酸組成の推移を検討するため、癌腫発生の有無にかかわらず、大腸癌発生過程として、8 日間連日注腸直後のラット (1 群)、注腸後 4 週経過したラット (2 群)、16 週経過ラット (3 群)、40 週経過ラット (4 群) 及び対照ラットの 5 群を用いた。

2. DMH 投与ラット

DMH (和光純薬工業株式会社製) は、重炭酸ソーダに溶解し、pH を 6 に調製した状態で 20 mg/kg をラット大腿皮下に 1 週間に 1 回注射した。DMH 誘発大腸癌担癌ラットにおける胆汁酸分析には、総投与量 400 mg/kg、および 400 mg/kg 投与後 4 週経過したラットで大腸に癌腫を有するものを用い、対照を無処置ラットとし、比較検討した。さらに、経時的な胆管内胆汁中胆汁酸組成の推移を検索するため、癌腫発生の有無にかかわらず、大腸癌発生過程として、総投与量 200 mg/kg 投与直後のラット (1' 群)、400 mg/kg 投与直後ラット (2' 群)、400 mg/kg 投与後 4 週経過ラット (3' 群) および対照ラットの 4 群を用いた。

3. 大腸癌判定基準

摘出された大腸において肉眼的に隆起性病変として観察されたものを腫瘍とし、組織学的な癌の判定はヒト腸癌判定基準に従い、大腸癌取り扱い規約¹⁸⁾に準じ検討した。

II. 胆汁酸の抽出と測定

1. 胆汁採取法

麻酔は 25 mg/kg の塩酸ケタミンを用い、正中切開にて開腹した。総胆管を末端部で結紮後、肝側総胆管を切開するとともに 3 号アトム静脈カテーテル (アトム株式会社製) を挿入し、滴下する胆汁を採取、うち 0.2 ml を胆汁酸測定に供した (図 1)。

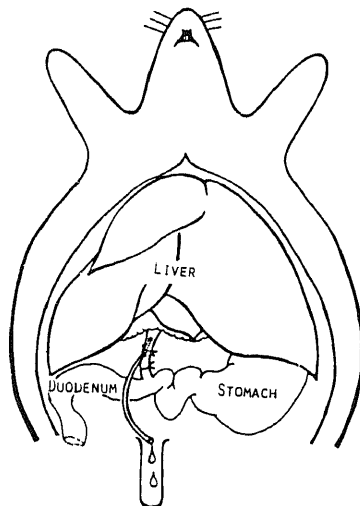


Fig. 1. Diagram to collect the bile from the rat.

2. 胆汁酸抽出法

1) 中性ステロール除去法

採取胆汁 0.2 ml に 4 ml のエタノールを加え 24 時間放置後これを振盪し、遠心(3500 回転, 10 分間)した。その上清 1 ml に 1 N 苛性ソーダ 4 ml とヘキサン 5 ml を添加振盪し、中性ステロールをヘキサン層に移した。同様の操作を 4 回繰り返し、残留液をテフロン試験管に入れた。また、試験管附着液は 1 N 苛性ソーダ:エタノール (1:1 V/V) 2 ml で洗い、テフロン試験管に追加した。

2) 抱合胆汁酸の加水分解ならびに遊離胆汁酸抽出法

試料の入ったテフロン試験管を沸騰水浴加温でエタノールを除去した後、オートクレーブ (120°C, 1 kg/cm²) で 4 時間加熱し胆汁酸をすべて遊離型に加水分解した。次いで 6 N 塩酸を用い pH1 に調整後、5 ml のエタノール添加操作を 3 回に亘り繰り返すことによって遊離型胆汁酸を抽出した。なお、内部標準物質として 5 β コラン酸のクロロホルム溶液および無水硫酸ナトリウム 5 g を添加攪拌後 1 時間放置し、ガラスフィルター (G₃) を用いて濾過した。

3) 胆汁酸カルボキシル基のメチルエステル化

室温下でロータリー式エバポレーターによって溶媒を減圧留去した。なお、管壁に付着した胆汁酸に対し

ては少量のエタノールを用い再度減圧留去した。これにエタノール 0.2 ml を加えるとともに黄色に着色するまで新鮮なジアゾメタンのエタノール溶液を添加し、密栓した状態で 20 分間放置した。

4) 胆汁酸側鎖水酸基のトリメチルシリル化

溶媒をデシケター (乾燥剤:五酸化リン) に入れ真空ポンプで 5 分間減圧吸引した後、80°C の恒温槽で 30 分間加温した。次いで、デシケターを室温に戻し、トリメチルケイ素化剤 (TMS-HT) 0.2 ml を加え、20 分間反応させた。

3. ガスクロマトグラフィーによる胆汁酸分析および定量

1) ガスクロマトグラフィー操作条件

島津 GC-4APF ガスクロマトグラフ (島津製作所株式会社製) を用い、次の操作条件とした。

カラム: 3 mm ϕ \times 2 m ガラスカラム

固定相液体: poly I 110, 0.20%

担体: Chromosorb W 80~100 NP

カラム温度: 200°C

試料注入部温度: 250°C

キャリアガス: He 50 ml/min

2) 胆汁酸の分析と定量

抽出操作により得られた溶液 1.5 μ l をガスクロマトに注入し、記録紙に描写されたガスクロマトグラム

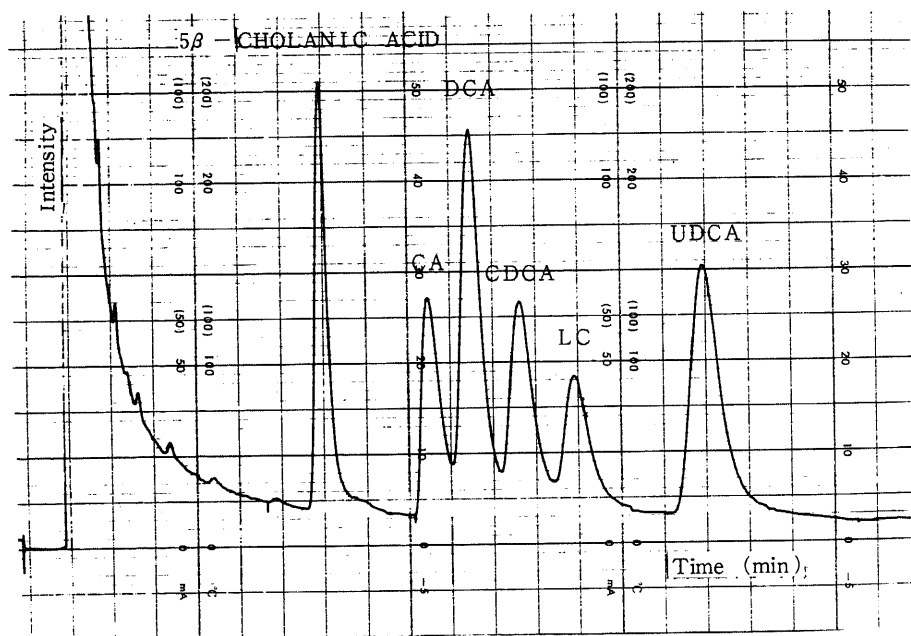


Fig.2. Gas-chromatographic standard elevation pattern of bile acids. CA, cholic acid; DCA, deoxycholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; LC, lithocholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid.

で、保持時間からコール酸 (cholic acid, CA), デオキシコール酸 (deoxycholic acid, DCA), ケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA), リトコール酸 (lithocholic acid, LC), ウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) の各種胆汁酸を同定した。また、これらの胆汁酸の含有量は、先に添加された標準物質である 5β コラン酸のピークに対する各ピークの高さの比率から算出した (図 2)。また、ラット胆汁中にガスクロマトグラムで LC の下行脚に同定不能のピークを認め、カラム固定相を 0.18%, 0.20%, 0.22% と変化させても保持時間が LC および UDCA と一致せず、またヒドロキシコール酸 (hydroxycholic acid) や β -ムリコール酸 (β -muricholic acid) と異っていたため、LC とともに未同定胆汁酸 X とした。同胆汁酸はラット 20 匹を検索し、LC 含有算出面積比が $83.0 \pm 2.2\%$ であったことから 2 次胆汁酸として扱った。

4. 胆汁酸組成比と 1 次胆汁酸量 / 2 次胆汁酸量値
ガスクロマトグラムによって同定、定量された各種胆汁酸の組成比を

$$\frac{0.2 \text{ ml 胆汁中各種胆汁酸量}}{0.2 \text{ ml 胆汁から得られた総胆汁酸量}} \times 100$$

で算出した。また、CA, CDCA, UDCA を 1 次胆汁酸に、DCA, LC およびラットにおける未同定胆汁酸 X を 2 次胆汁酸とし、両者の総量比で 1 次胆汁酸量 / 2 次胆汁酸量値を算出した。

III. 大腸癌患者における胆汁中胆汁酸の測定

1. 対象

腸閉塞症状を伴わない大腸癌患者 13 例について胆嚢内胆汁中の胆汁酸組成を検索し、肝機能正常な胃潰瘍患者 8 例の胆汁酸組成と対比較した。

2. 胆汁の採取および胆汁酸測定

大腸癌ならびに胃潰瘍に対する外科的治療を目的とした全身麻酔下開腹時に、手術操作の開始に先立ち胆嚢を穿刺し、胆嚢内胆汁約 10 ml を採取、うち 0.2 ml を速やかに胆汁酸測定に供した。胆汁酸の測定は前述の胆汁酸抽出法に準じて、胆嚢胆汁から胆汁酸を抽出し、島津 GC-4APF ガスクロマトグラフを用い、前記の操作条件にて測定・分析した。

IV. 統計学的検定法

統計学的検定には STUDENT'S T-TEST を用いて有意差検定を行ない、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。なお、成績は、 $\text{MEAN} \pm \text{S.D.}$ で表わした。

成 績

I. MNNG または DMH 誘発大腸癌担癌ラットにおける癌腫の病理組織学的所見

1. 占居部位

MNNG および DMH の 2 種の発癌物質によって誘発された癌腫の占居部位を対比すると、MNNG 誘発大腸癌では 15 個の癌腫すべてが遠位大腸を占めたのに対し、DMH 誘発大腸癌では 15 個中 12 個 (80%) が近位大腸を占め、両者で癌腫の占居部位を異にした (図 3)。

2. 癌腫個数

誘発された癌腫の個数は MNNG および DMH 群ともに 10 匹 15 個で、両群とも 6 匹が単発性を示し、一方多発性の 4 匹の内訳は 2 個が 3 匹、3 個が 1 匹と両群ともに近似した癌腫の発生個数状態を示した (表 1-1, 表 1-2)。

3. 肉眼形態

大腸癌取り扱い規約に準じ癌腫の肉眼形態を分類すると、MNNG 誘発大腸癌で得られた 15 個の癌腫のう

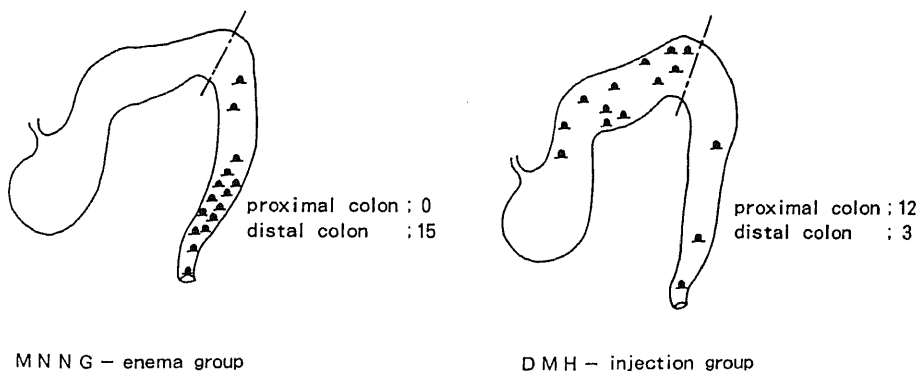


Fig. 3. Location of colon carcinomas induced by MNNG or DMH. The figures represent number of colon carcinomas in 10 rats.

ち13個までが表在型で、うちI p型が6個(40%)と最も多く、次いでI s型4個、II a型2個、II a+II c型1個であった。一方、進行癌はBorrmann 1型、Borrmann 2型の各1個であった(表1-1)。DMH誘発大腸癌では逆に表在型はII a型の3個のみで、他はBorrmann 1型が11個(73.3%)、Borrmann 2型1個で、MNNG誘発大腸癌に比しDMH誘発大腸癌が進行癌の肉眼形態を示す癌腫の多い傾向を示した(表1-2)。

4. 深達度

深達度はMNNG誘発大腸癌では15個の癌腫のう

ち13個(86.7%)までがsmで、2個にssを認めたにすぎない(表1-1)。一方、DMH誘発大腸癌の深達度はsm 3個、pm 4個、ss 7個、s 1個で、MNNG誘発大腸癌と異なりpm以上の深達度を示した癌腫が12個(80%)を占めた(表1-2)。

5. 組織型

癌腫の組織型については、MNNG誘発大腸癌では全例高分化腺癌を示した(表1-1)のに対し、DMH誘発大腸癌では15個中11個(73.3%)までが粘液癌を示し、他の5個の組織型は3個が高分化腺癌、1個が印環細胞癌で(表1-2)、両者により誘発された癌

Table 1-1. Histologic classification of MNNG-induced colon carcinomas

Case	No. of carcinomas	Macroscopic * classification	Histological type **	Depth of invasion
1	1	Borrmann 1	Well diff. a. c.	ss
2	1	Is	Well diff. a. c.	sm
3	2	Ip, Is	Well diff. a. c.	sm, sm
4	3	Ip, Ip, IIa+IIc	Well diff. a. c.	sm, sm, sm
5	1	Borrmann 2	Well diff. a. c.	ss
6	1	Ip	Well diff. a. c.	sm
7	2	IIa, Ip	Well diff. a. c.	sm, sm
8	2	Ip, Is	Well diff. a. c.	sm, sm
9	1	IIa	Well diff. a. c.	sm
10	1	Is	Well diff. a. c.	sm

* Morphological classification of colon carcinomas was performed by General Rules of Japanese Research Society for Cancer of Colon and Rectum.

**Well diff. a. c., well differentiated adeno carcinoma.

***sm, submucosal layer; ss, subserosal layer.

Table 1-2. Histologic classification of DMH-induced colon carcinomas

Case	No. of carcinomas	Macroscopic classification	Histological type**	Depth of invasion***
1	1	Borrmann 1	mucinous c.	ss
2	1	Borrmann 1	mucinous c.	ss
3	2	Borrmann 1, IIa	mucinous c., a. c.	pm, sm
4	1	Borrmann 1	mucinous c.	ss
5*	3	Borrmann 1, 2, 1	mucinous c., mucinous c. sig. ring c. c.	ss, s, ss
6	2	Borrmann 1, IIa	mucinous c., a. c.	pm, sm
7	2	Borrmann 1, IIa	mucinous c., a. c.	ss, sm
8	1	Borrmann 1	mucinous c.	pm
9	1	Borrmann 1	mucinous c.	pm
10	1	Borrmann 1	mucinous c.	ss

*With liver metastasis, peritoneal dissemination and duodenal carcinoma.

**mucinous c., mucinous carcinoma; sig-ring c. c., signet ring cell carcinoma.

***pm, proper muscular layer; s, serosal layer.

腫の組織型に明らかな差異がみられた。

II. MNNG または DMH 誘発大腸癌担癌ラットにおける胆汁中胆汁酸組成

1. 胆汁酸組成比

MNNG 誘発大腸癌ラットと対照の生食注腸ラット

の胆汁中胆汁酸組成を図4に示した。DCA, CDCA, UDCA 組成比については両者間に有意の差はみられなかったが、CA および未同定胆汁酸 X については両者間に顕著な差がみられた。CA 組成比は、対照群の $58.3 \pm 5.7\%$ に対し、担癌群では $75.7 \pm 7.5\%$ と有意の

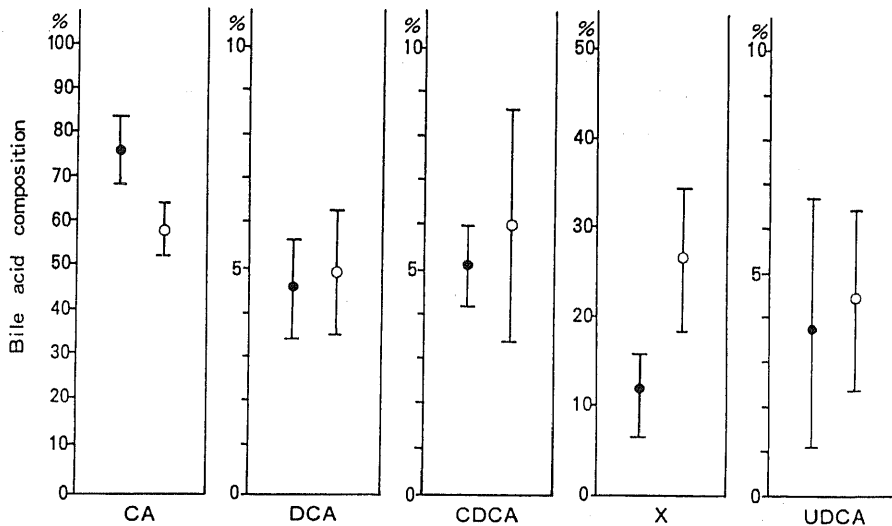


Fig. 4. Bile acid composition in bile of rats with MNNG-induced colon cancer (●, n=10) and of controls (○, saline enema rats, n=10). Each point represents the mean \pm S.D. Significant differences were observed in CA and unidentified bile acid (X) between rats with MNNG-induced colon cancer and controls ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively).

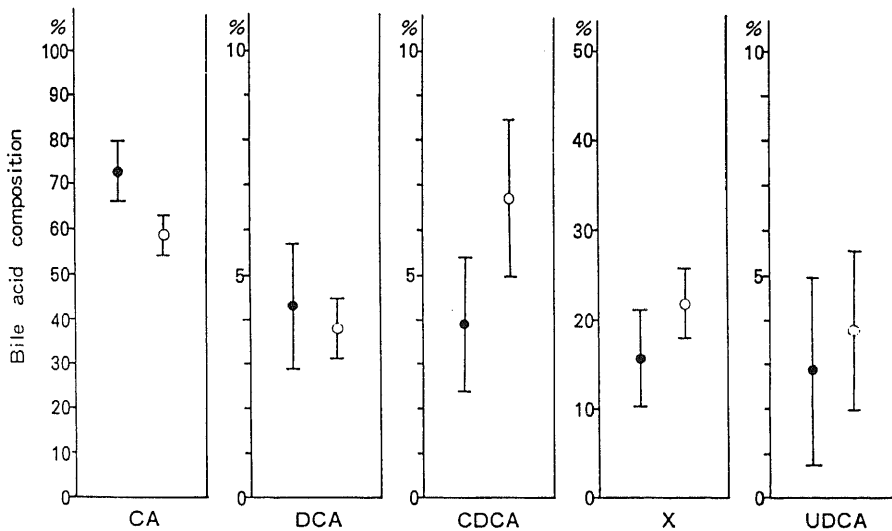


Fig. 5. Bile acid composition in bile of rats with DMH-induced colon cancer (●, n=9) and of controls (○, untreated rats, n=10). Each point represents the mean \pm S.D. Significant differences were observed in CA, CDCA and unidentified bile acid (X) between rats with DMH-induced colon cancer and controls ($p < 0.01$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively).

高値を示した ($p < 0.01$)。一方、未同定胆汁酸 X の組成比は、対照の $26.5 \pm 8.0\%$ に対し、担癌群では $11.2 \pm 4.8\%$ と、逆に担癌群で有意の低値を示した ($p < 0.01$)。

DMH 誘発大腸癌ラットと対照の無処置ラットの胆汁中胆汁酸組成を図 5 に示した。DCA, UDCA 組成比については両者間に有意の差はみられなかったが、CA, CDCA および未同定胆汁酸 X については両者間に有意の差がみられた。CA 組成比は、対照群の $58.5 \pm 4.3\%$ に対し、担癌群では $72.5 \pm 6.6\%$ と担癌群で有意に高値を示した ($p < 0.01$)。また、CDCA 組成比は、対照群の $6.8 \pm 1.6\%$ に対し、担癌群では $3.9 \pm 1.5\%$ であり、未同定胆汁酸 X の組成比は、対照群の $22.0 \pm 3.9\%$ に対し、担癌群では $15.8 \pm 5.6\%$ と、いずれも担癌群で有意に低かった ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

2. 1 次胆汁酸量/2 次胆汁酸量値

担癌ラットにおける 1 次胆汁酸量と 2 次胆汁酸量の比率を検討すると (図 6), MNNG 誘発大腸癌群では、対照の生食注腸群での 2.4 ± 0.8 に対し、担癌群では

5.9 ± 1.7 と有意に高値を示した ($p < 0.01$)。同様に DMH 誘発大腸癌群でも、無処置群の 3.1 ± 1.3 に対し、担癌群では 4.6 ± 1.5 と有意差をもって高値を示した ($p < 0.05$)。

3. CA/DCA 値

担癌ラットにおける CA 量と DCA 量の比率を図 7 に示す。MNNG 誘発大腸癌群では、生食注腸群の 13.3 ± 4.2 に対し、担癌群では 17.8 ± 3.1 と担癌群で有意の差が高かった ($p < 0.01$)。また、DMH 誘発大腸癌群においても、無処置群の 14.0 ± 2.7 に対し、担癌群では 16.9 ± 4.2 と同様の傾向を示した ($p < 0.05$)。

III. MNNG または DMH 投与に伴うラット腸粘膜の経時的な組織学的変化

1. MNNG 注腸投与に伴う組織学的変化

MNNG 注腸投与に伴う大腸粘膜の経時的変化をみると (表 2), 生食注腸群では粘膜面には全く変化がみられなかったのに対し、MNNG 注腸直後のラット (1 群) では遠位大腸を中心に粘膜靡爛が 10 匹中 6 匹

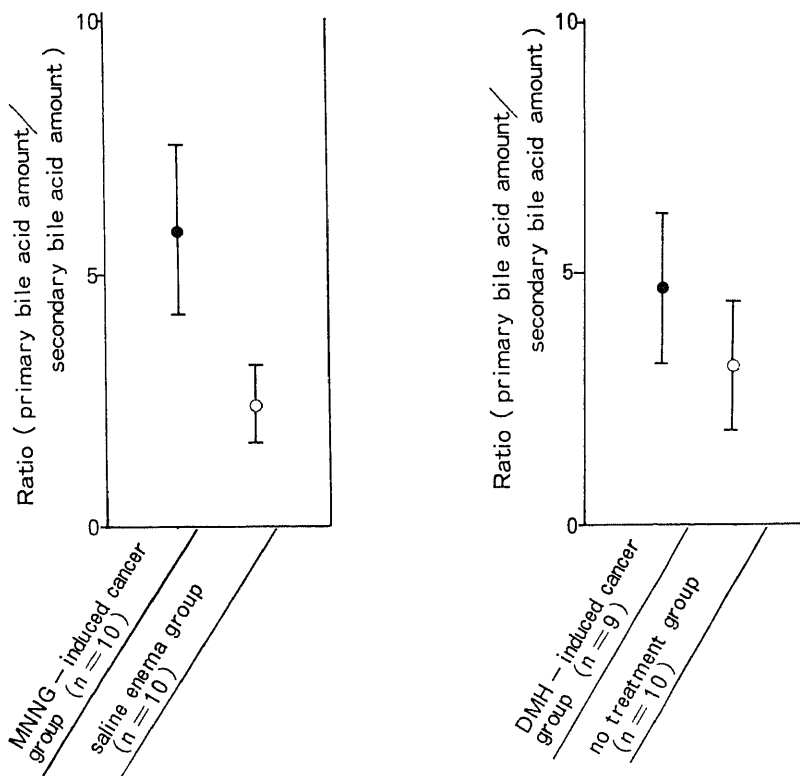


Fig. 6. Ratios of primary to secondary bile acid amount in bile collected from the bile duct of rats. Each point represents the mean \pm S.D. Significant differences were observed between rats with colon cancer and controls in both the MNNG group ($p < 0.01$) and DMH group ($p < 0.05$). n, number of rats.

Table 2. Numbers of colon tumors induced by MNNG-enema

	control (saline enema) (n=10)	just after MNNG enema (n=10) (group 1)	4 weeks after MNNG enema (n=8) (group 2)	16 weeks after MNNG enema (n=9) (group 3)	40 weeks after MNNG enema (n=9) (group 4)
adenomatous polyp	0	0	0	2	5
hyperplastic polyp	0	0	0	0	1
adenocarcinoma	0	0	0	0	8

n, number of rats

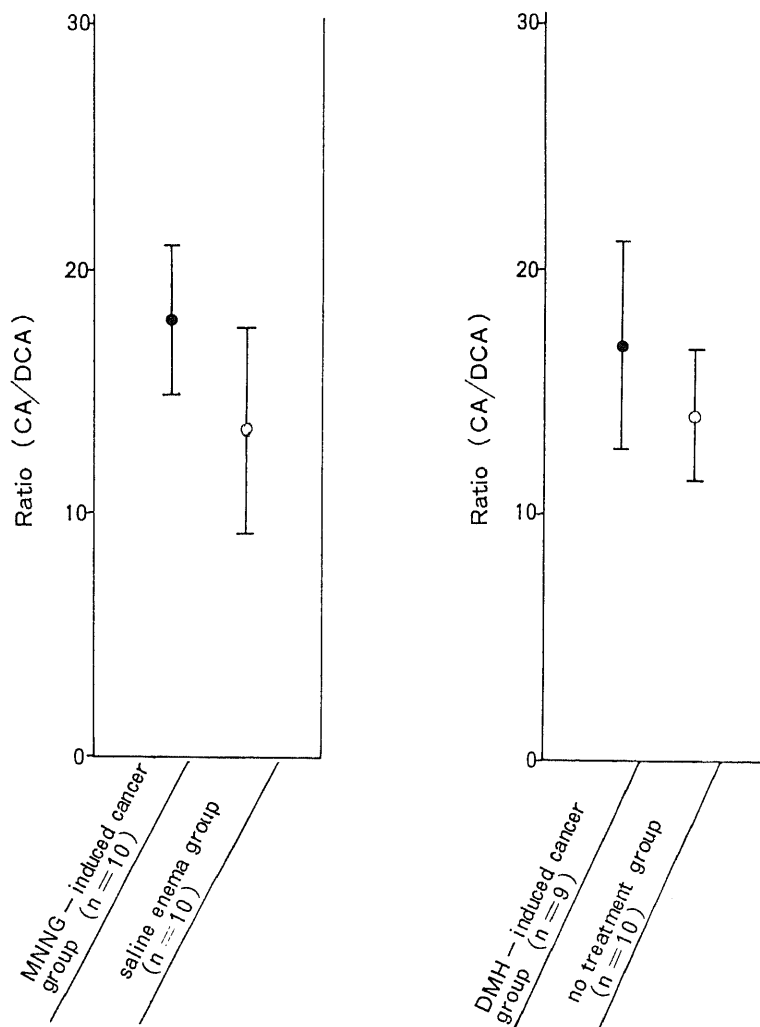


Fig. 7. Ratios of CA to DCA in bile collected from the bile duct of rats. Each point represents the mean \pm S.D. Significant differences were observed between rats with colon cancer and controls in both the MNNG group ($p < 0.01$) and DMH group ($p < 0.05$). n, number of rats.

(60%)に、MNNG注腸後4週を経過したラット(2群)では8匹中3匹(37.5%)に、MNNG注腸後の早期の大腸粘膜の変化として観察された。腺腫性ポリープの発生はMNNG注腸後16週を経過したラット(3群)よりみられ、9匹中2匹(22.2%)に認められた。なお、3群では過形成ポリープ、腺癌は観察されなかった。一方、注腸後40週を経過したラット(4

群)では9匹中6匹(66.6%)に8個の腺癌の発生を認め、また腺腫性ポリープ9匹中4匹(44.4%)に5個、過形成ポリープ9匹中1匹(11.1%)に1個の発生が確認された。

2. DMH投与に伴う組織学的変化

DMH投与による大腸粘膜の経時的変化をみると(表3), DMH総投与量200 mg/kg投与直後のラッ

Table 3. Numbers of colon tumors induced by DMH-injection

	control (n=10) (no treatment)	DMH injection total dose 200 mg/kg (n=8) (group 1')	DMH injection total dose 400 mg/kg (n=7) (group 2')	4 weeks later DMH injection total dose 400 mg/kg (n=8) (group 3')
adenomatous polyp	0	2	1	3
hyperplastic polyp	0	0	0	2
adenocarcinoma	0	0	1	14

n, number of rats

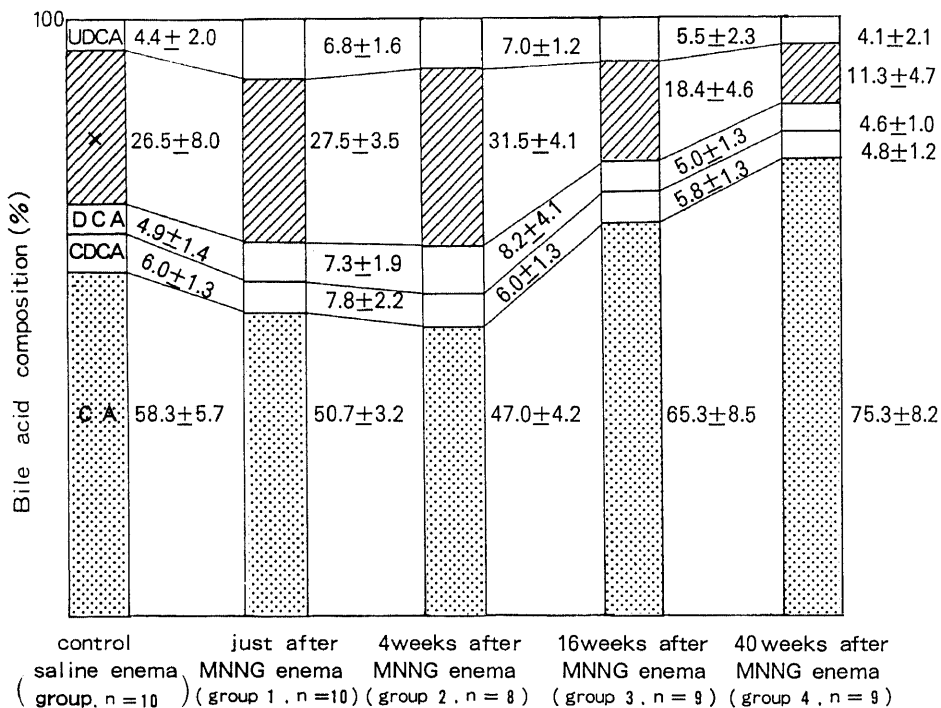


Fig. 8. Composition of bile acids in the bile during development of MNNG-induced colon cancer. Percentage of CA was significantly decreased in both group 1 and 2 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively), and unidentified bile acid(X) was significantly increased in both group 1 and 2 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively), whereas CA was significantly increased in both group 3 ($p < 0.01$) and group 4 ($p < 0.01$), and X was significantly decreased in both group 3 ($p < 0.01$) and group 4 ($p < 0.01$), when compared to control. n, number of rats.

ト(1'群)で8匹中2匹(25%)に腺腫性ポリープの発生を認めたが癌腫の発生はみられなかった。DMH総投与量400 mg/kg投与直後のラット(2'群)では7匹中1匹(14.3%)に癌腫と腺腫性ポリープの発生がみられ、さらにDMH総投与量400 mg/kg投与後4週を経過したラット(3'群)では8匹中8匹(100%)に14個の癌腫と、腺腫性ポリープ3個、過形成ポリープ2個の発生が認められた。

IV. 大腸癌発生過程における胆汁中胆汁酸組成

1. 胆汁酸組成比

MNNG注腸ラットにおける経時的な各種胆汁酸組成比の推移を図8に示す。CA組成比では、生食注腸群(対照群)の 58.3 ± 5.7 に対し、MNNG注腸直後のラット(1群) $50.7 \pm 3.2\%$ 、MNNG注腸後4週を経過したラット(2群) $47.0 \pm 4.2\%$ と、MNNG注腸直後から4週までは対照群に比し有意の低値($p < 0.01$)を示したが、MNNG注腸後16週を経過したラット(3群)では $65.3 \pm 8.5\%$ 、MNNG注腸後40週を経

過したラット(4群) $75.3 \pm 8.2\%$ と、16週以降では逆に有意に高値($p < 0.01$)となった。CDCA、DCA、UDCAの各組成比の推移には有意差は認められなかったが、未同定胆汁酸Xの組成比は、対照群の $26.5 \pm 8.0\%$ に対し、1群 $27.5 \pm 3.5\%$ 、2群 $31.5 \pm 4.1\%$ 、3群 $18.4 \pm 4.6\%$ 、4群 $11.3 \pm 4.7\%$ と、MNNGの注腸から4週までは有意の増加($p < 0.01$)を示したのに対し、16週以降では逆に有意差をもって減少した($p < 0.01$)。

DMH投与ラットにおける経時的な各種胆汁酸組成比の推移を図9に示す。CA組成比は、無処置ラット(対照群)の $58.5 \pm 4.3\%$ に対し、DMH総投与量200 mg/kg投与直後のラット(1'群)では $68.5 \pm 5.2\%$ 、DMH総投与量400 mg/kg投与直後のラット(2'群)では $69.0 \pm 7.2\%$ 、DMH400 mg/kg投与後4週を経過したラット(3'群)では $69.4 \pm 7.8\%$ と、1'群以降は有意の増加を示した($p < 0.01$)。DCA組成には有意の変化は認められなかったが、CDCA組成比は、対

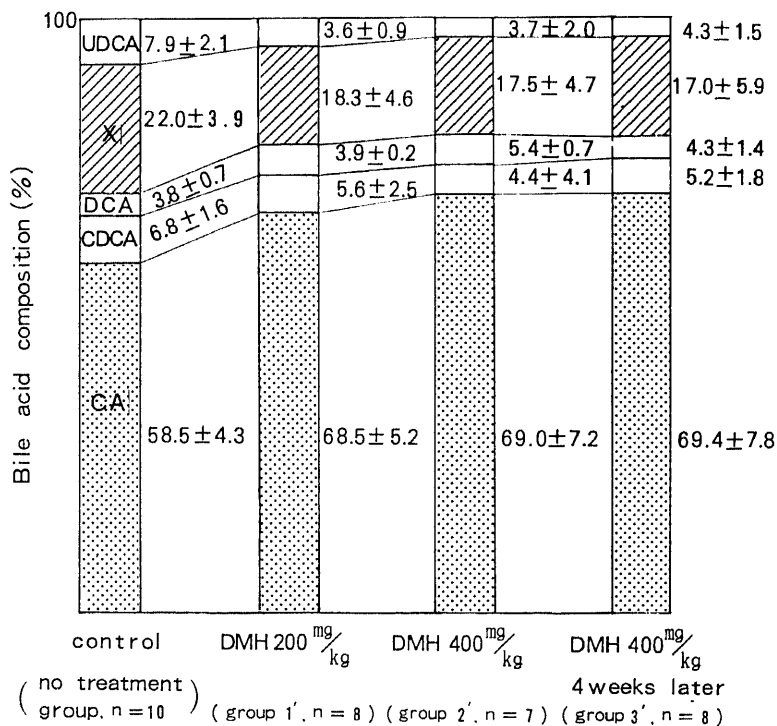


Fig. 9. Composition of bile acids in the bile during development of DMH-induced colon cancer. group 1', total dose 200mg/kg of DMH was injected; group 2', total dose 400mg/kg of DMH was injected; group 3', 4 weeks after total dose 400 mg/kg of DMH was injected. Percentage of CA was significantly increased in both group 1', group 2' and group 3' ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively), and percentages of CDCA, unidentified bile acid(X) and UDCA were significantly decreased in group 1' ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), when compared to control. n, number of rats.

照群の $6.8 \pm 1.6\%$ に対し, 1'群 $5.6 \pm 2.5\%$, 2'群 $4.4 \pm 4.1\%$, 3'群 $5.2 \pm 1.8\%$, UDCA 組成比も, 照群の $7.9 \pm 2.1\%$ に対し, 各々 $3.6 \pm 0.5\%$, $3.7 \pm 2.0\%$, $4.3 \pm 1.5\%$ と, 1'群以降 CDCA 組成比は $p < 0.05$, UDCA 組成比は $p < 0.01$ の有意差をもって減少した。また, 未同定胆汁酸 X の組成比も, 照群の $22.0 \pm 3.9\%$ に対し, 1'群 $18.3 \pm 4.6\%$, 2'群 $17.5 \pm 4.7\%$, 3'群 $17.0 \pm 5.9\%$ と, 1'群以降は有意の減少 ($p < 0.05$) のまま推移した。

2. 1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値

MNNG 注腸ラットにおける経時的な 1 次胆汁酸量と 2 次胆汁酸量の比率をみると (図 10), 生食注腸群の 2.4 ± 0.8 に対し, 1 群では 1.9 ± 0.2 , 2 群 1.6 ± 0.4 と

両群ともに有意の減少を示した ($p < 0.05$)。一方, 3 群では 3.5 ± 0.9 , 4 群 5.9 ± 1.7 と逆に有意差をもって高値を示した ($p < 0.01$)。

DMH 投与ラットでは, 無処置群の 2.9 ± 0.6 に対し, 1'群 5.1 ± 1.4 , 2'群 3.5 ± 0.8 , 3'群 3.8 ± 1.7 と, 1'群で明らかな高値を示し ($p < 0.01$), 以後も高値 ($p < 0.05$) を持続した (図 11)。

3. CA/DCA 値

MNNG 注腸ラットにおける経時的な CA/DCA 値の推移をみると (図 12), 生食注腸群の 13.3 ± 4.2 に対し, 1 群 7.2 ± 1.6 , 2 群 6.9 ± 2.6 と MNNG 注腸直後から 4 週にかけて低値を示した ($p < 0.01$)。一方, 3 群 14.5 ± 5.1 , 4 群 17.5 ± 4.7 と 16 週以降では逆に有

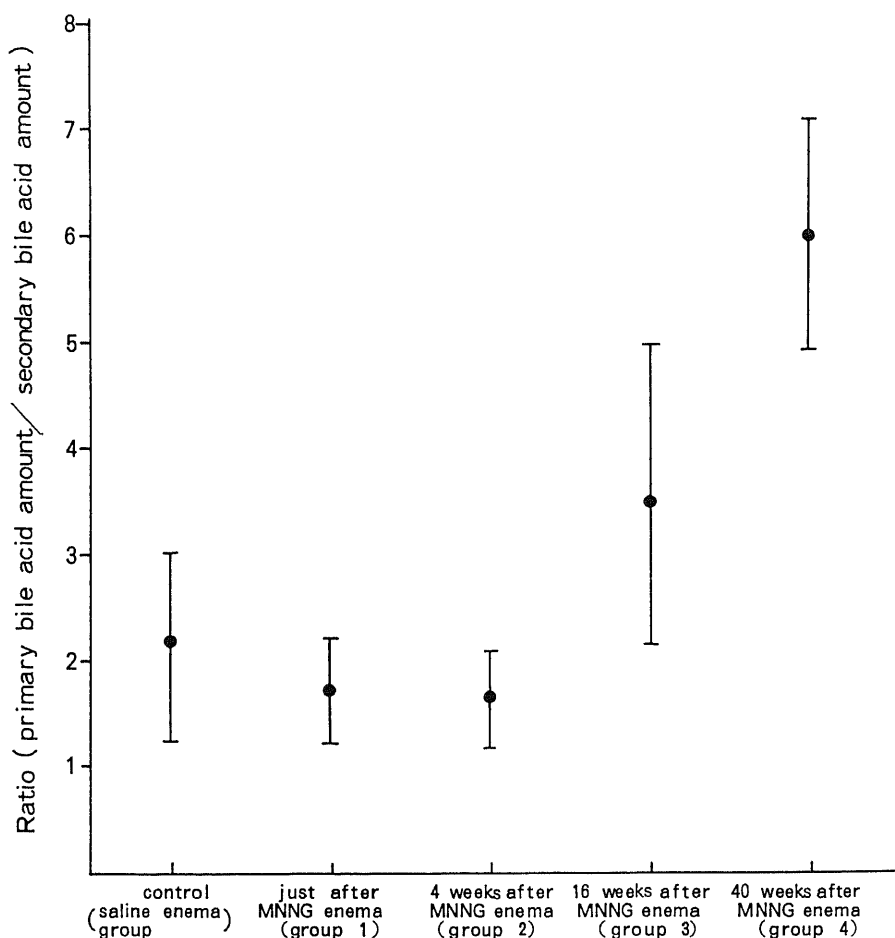


Fig. 10. Ratio of primary to secondary bile amount in the bile collected from the bile duct during development of MNNG-induced colon cancer. Each point represents the mean \pm S.D. Ratios were significantly decreased in both group 1 ($p < 0.05$) and group 2 ($p < 0.05$), and increased in both group 3 and group 4 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively), when compared to control.

意差をもって高値を示した ($p < 0.01$).

DMH 投与ラットでは、無処置群の 14.0 ± 2.7 に対し、1'群 17.6 ± 2.6 , 2'群 15.9 ± 1.9 , 3'群 16.5 ± 2.9 と、DMH 投与量 200 mg/kg 以降では有意の高値 ($p < 0.01$) のまま推移した (図 13).

V. 大腸癌患者における胆汁中胆汁酸組成

1. 胆汁酸組成比

ガスクロマトグラムから得られた各種胆汁酸の組成比は、対照の胃潰瘍患者では CA 組成比 $38.2 \pm 11.3\%$, DCA 組成比 $16.8 \pm 4.7\%$, CDCA 組成比 $37.6 \pm 6.7\%$, UDCA 組成比 $7.3 \pm 3.7\%$ を示し、LC 組

成比は検出された 4 例で、 $4.1 \pm 2.1\%$ を示した。一方大腸癌患者では CA 組成比 $39.1 \pm 9.7\%$, DCA 組成比 $7.9 \pm 3.9\%$, CDCA 組成比 $47.0 \pm 7.0\%$, UDCA 組成比 $7.0 \pm 2.8\%$, LC 組成比は検出された 5 例で $3.2 \pm 0.9\%$ を示した。両群間の各胆汁酸組成比を対比すると CA, UDCA, LC の各組成比は両者間に差異を認めなかったが、DCA 組成比は大腸癌患者では胃潰瘍患者に比し有意の低値 ($p < 0.01$) を示し、逆に CDCA 組成比は大腸癌患者で有意差をもって高値 ($p < 0.01$) を示した (図 14).

2. 1 次胆汁酸量 / 2 次胆汁酸量値

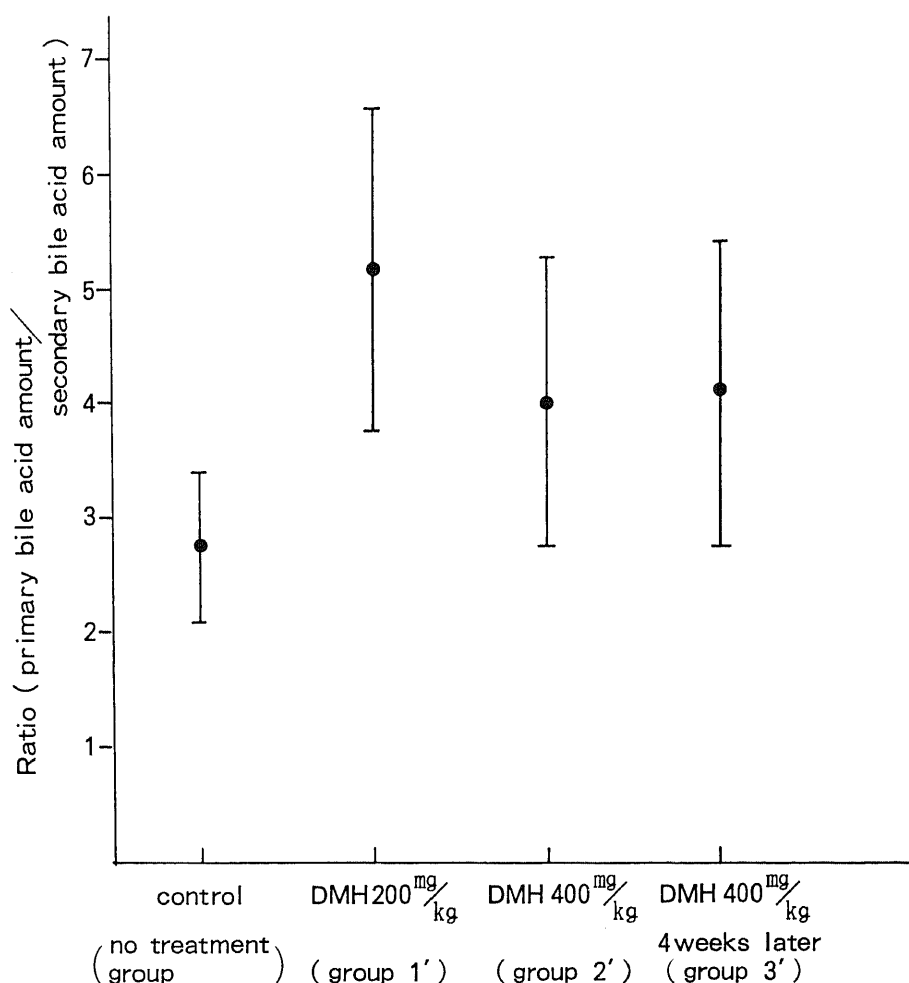


Fig. 11. Ratio of primary to secondary bile acid amount in bile collected from the bile duct during development of DMH-induced colon cancer. group 1', total dose 200 mg/kg of DMH was injected; group 2', total dose 400 mg/kg of DMH was injected; group 3', 4 weeks after total dose 400 mg/kg of DMH was injected. Each point represents the mean \pm S.D. Ratios were significantly increased in both group 1' ($p < 0.01$), group 2' ($p < 0.05$) and group 3' ($p < 0.05$), when compared to control.

胆汁中の1次胆汁酸量と2次胆汁酸量の占める割合は、胃潰瘍患者の 4.7 ± 2.6 に対し、大腸癌患者では 12.6 ± 6.0 と大腸癌患者で明らかな高値を示した($p < 0.01$) (図15)。

3. CA/DCA 値

CA量とDCA量の比率に関しては、胃潰瘍患者の 2.5 ± 1.4 に対し、大腸癌患者は 5.8 ± 3.7 を示し、大腸癌患者で有意差をもって高値を示した($p < 0.05$) (図15)。

考 察

大腸癌の発生要因は幾多の疫学的研究から、環境因子、とくに食餌性因子と密接な関連性を有することが指摘されている¹⁾⁻⁵⁾⁹⁾¹⁹⁾。しかし、大腸癌の carcino-

genesisを論ずる場合、発癌因子 (initiator) と促進因子 (promotor) の両面からの検討が重要である²⁰⁾。Sander ら⁷⁾は、胃内で亜硝酸と二級アミンから、発癌性を有するN-ニトロソ化合物が生成されることを報告した。さらに近年、大腸内においても、腸内細菌の作用によって食餌中の硝酸が亜硝酸に還元され²¹⁾、また、リジンからピペリジン、アルギニンやオルニチンからピロリジン、コリンからジメチルアミンのごとく、アミノ酸から二級アミンに変換されることが証明され²²⁾、胃内と同様、N-ニトロソ化合物の産生される可能性が示唆されている。これは、Varghese ら²³⁾が微量ではあるが、人糞便中にN-ニトロソ化合物を検出したこと、さらには、尿管・S状結腸吻合術をうけた患者では、腸内細菌によって尿中の硝酸とアミンからN-ニト

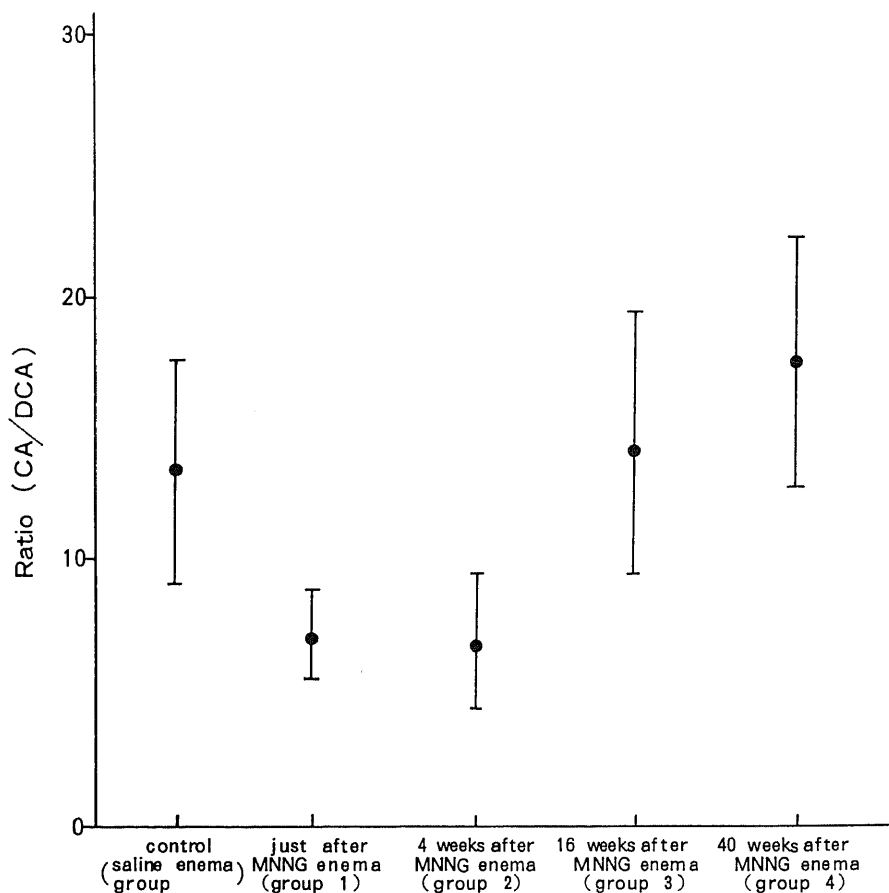


Fig. 12. Changes in CA/DCA ratio during development of MNNG-induced colon cancer. Each point represents the mean \pm S.D. Ratios were significantly decreased in both group 1 and 2 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively), when compared to control, whereas they were significantly increased in group 3 compared to group 2 ($p < 0.01$), and increased in group 4 compared to control ($p < 0.05$).

ロソ化合物が容易に生成されるため結腸癌発生リスクが極めて高いことなどの報告²⁴⁾からも裏付けられる。この initiator としての N-ニトロソ化合物のもととなる硝酸やアミノ酸は日常の食餌で摂取されているものであり、このことは個体が食生活を営む限り絶えず大腸癌発生の負荷状態にあることを意味する。一方、Wynder ら³¹⁾⁹⁾²⁵⁾は世界各国の脂肪消費量と大腸癌発生率の間に高い相関性のあることを指摘し、本邦における大腸癌発生率の急増要因は食生活の欧米化に伴う

脂肪摂取量の増加に基づくとしている。Nigro ら²⁶⁾は発癌物質アゾキシメタンによる大腸癌発癌実験で腫瘍発生個数が高脂肪飼料の投与で有意の増加を認め、さらに、Reddy ら²⁷⁾は DMH 誘発大腸癌に対し 5% コーンオイル、20% コーンオイル、5% ラード、20% ラードの各種脂肪添加飼料群を設定し、得られた腫瘍発生率が脂肪の種類に関係なく投与された脂肪量と相関したことを報告している。かかる高脂肪食の摂取が代謝過程で胆汁酸と密接に関連することは周知のところで

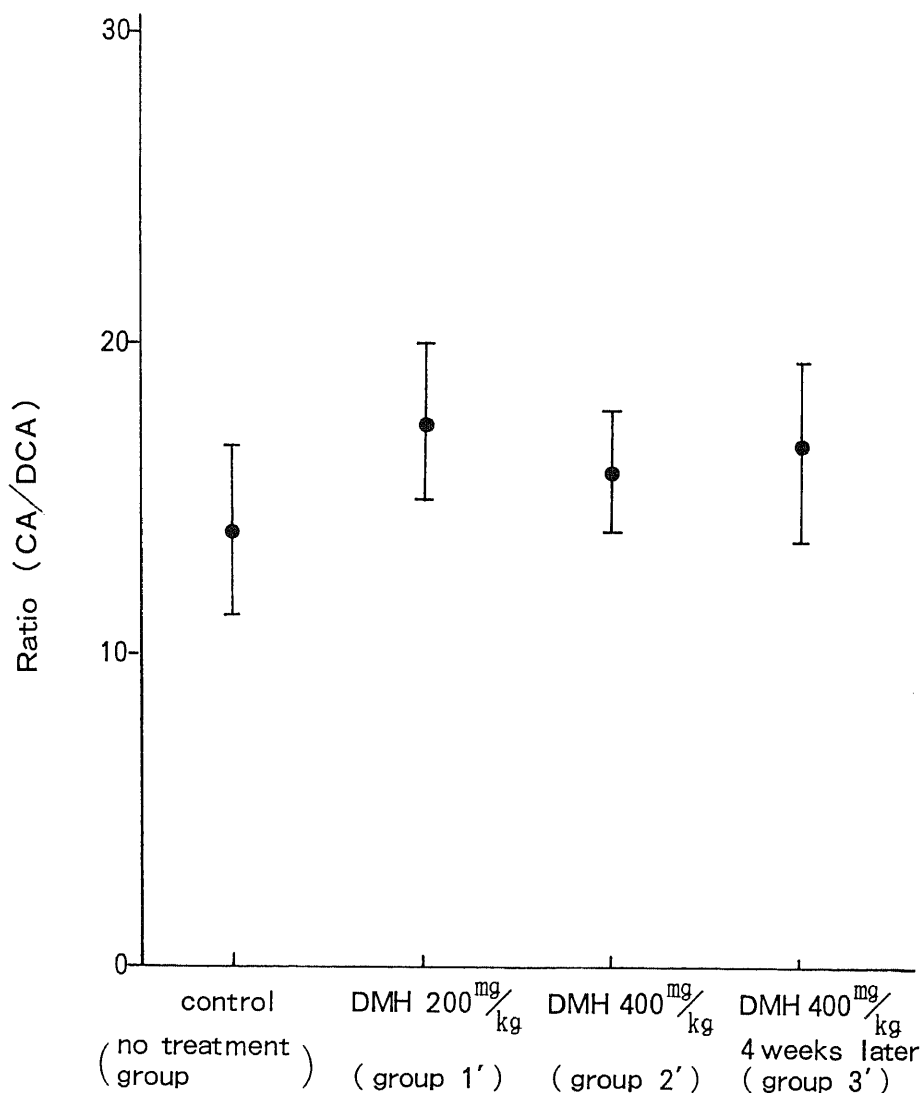


Fig. 13. Changes in CA/DCA ratio during development of DMH-induced colon cancer. group 1', total dose 200 mg/kg of DMH was injected; group 2', total dose 400 mg/kg of DMH was injected; group 3', 4 weeks after total dose 400 mg/kg of DMH was injected. Each point represents the mean \pm S.D. Ratios were significantly increased in both group 1' ($p < 0.01$), group 2' ($p < 0.05$) and group 3' ($p < 0.05$), when compared to control.

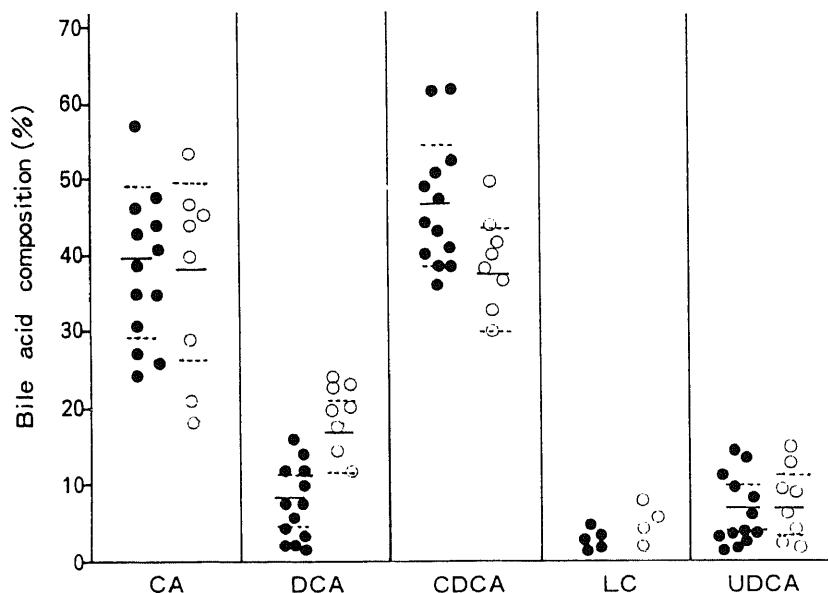


Fig. 14. Composition of bile acids in the gall bladder bile collected from human patients with colon cancer (●, n=13) and patients with gastric ulcer (○, n=8). Significant differences were observed in DCA and CDCA between patients with colon cancer and those with gastric ulcer ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively).

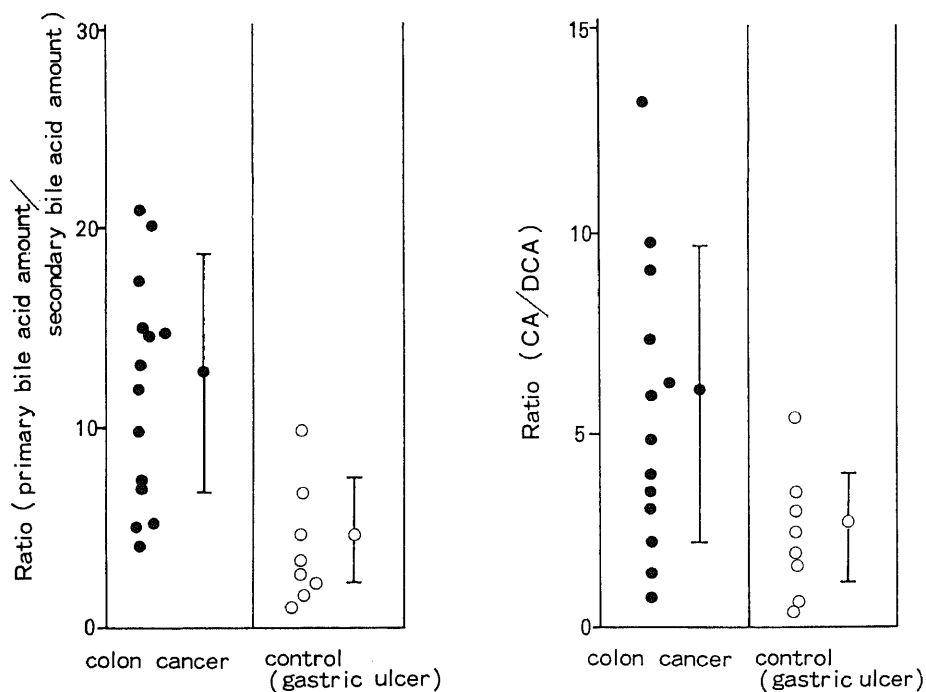


Fig. 15. Ratios of primary to secondary bile acid amount (right) and CA to DCA amount (left) in patients with colon cancer (●, n=13) and gastric ulcer (○, n=8). Differences in ratios between patients with colon cancer and patients with gastric ulcer were significant ($p < 0.01$ for primary to secondary bile acid amount ratio, $p < 0.05$ for CD/DCA ratio).

ある²⁸⁾²⁹⁾。すなわち、高脂肪食の摂取は胆汁酸代謝過程に対しコレステロール供給の増加のみならず、脂肪酸、グリセリドとの混合ミセル形成によるコレステロール吸収効率の増大を惹起し、胆汁酸生成の促進とともに胆汁酸排泄量の増加をきたすとされている³⁰⁾³¹⁾。この高脂肪食摂取に伴う胆汁酸代謝の変化に着目し、Reddy ら¹⁰⁾は糞便中胆汁酸の分析から、脂肪摂取量の多い米国人での胆汁酸排泄量は日本人や中国人の3～5倍に達し、しかも胆汁酸組成でもCAは約1.5～3倍、DCAは約2.5～5倍、LCは約4倍を示したとし、米国人での大腸癌罹患率の高い事実とあわせて、糞便中の胆汁酸排出量の増加や胆汁酸組成の変化が大腸癌発生と密接に関連していると述べている。同様にHill ら¹¹⁾¹²⁾³²⁾も本邦を含めた各国の大腸癌発生率と糞便中胆汁酸排泄量とが正の相関を示したことから、糞便内への胆汁酸排泄量の増加が大腸癌に対し促進的に関与すると結んでいる。また、Narisawa ら¹³⁾はMNNG誘発大腸癌ラットで、胆汁酸の付加注射投与によって腫瘍発生率に有意の増加がみられたとしている。さらに、片山¹⁴⁾は盲腸部での人工肛門造設から便流遮断空置大腸ラットを作製し、MNNGに加え各種胆汁酸の付加注射投与を行い、腫瘍発生率が便流非遮断群において遮断群に比べ著明に高く、また、1次胆汁酸の付加投与では腫瘍発生率の増加がみられなかったのに対し、DCAあるいはLCなどの2次胆汁酸の付加投与で有意の増加を示したと報告している。すなわち、大腸癌発生上、胆汁酸、とくに2次胆汁酸がpromotorとして作用することを示唆した。胆汁酸代謝に影響を及ぼす要因としては、高脂肪食など代謝過程を直接左右する食餌性因子のほか、腸内細菌叢の変化に伴う1次胆汁酸から2次胆汁酸への変換阻害^{11)33)～36)}、大腸粘膜細胞の損傷に基づく胆汁酸の吸収障害³⁷⁾などが挙げられる。しかし、低脂肪あるいは無脂肪食でも少なからず大腸癌の発生のみられること¹⁵⁾、MNNGやDMHなど発癌物質の単独投与でも高率に大腸癌発生を示すこと¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾などを考慮すると、元来生体で閉鎖的な代謝過程を繰り返している胆汁酸が、生体内のN-ニトロソ化合物や外来性の発癌物質によって直接的あるいは間接的な影響を受け、大腸癌発生に対し促進的な内的環境を形成していく可能性を推察させる。

そこで、著者は先ず実験的にMNNGおよびDMHの2種の発癌物質によって誘発された大腸癌担癌ラットを作製し、それらの胆管内胆汁中胆汁酸組成を検討した。その結果、MNNG誘発大腸癌群では対照群のCA組成比に対し担癌群では有意の増加を示し、また2次胆汁酸とされる末同定胆汁酸Xの組成比は対照

群に対し担癌群では有意の低値を示した。同様にDMH誘発大腸癌群でもCA組成比は対照とした無処置群に対し担癌群で有意の高値を示し、また末同定胆汁酸Xの組成比についても対照群に対し担癌群では有意に低値を示した。また、1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値はMNNG誘発大腸癌群では対照群に対し担癌群では有意の高値を、またDMH誘発大腸癌群でも対照群に対し担癌群では有意差をもって高値を示した。さらにCA/DCA値もMNNG誘発大腸癌群およびDMH誘発大腸癌群では対照群に対し、ともに有意差をもって高値を示した。

さて、発癌物質MNNGはNarisawa ら¹³⁾によってラットに注射投与することで高率に腺癌の発生することが発見され、その作用機序は大腸粘膜に対する直接的な接触作用に依存するもので³⁸⁾、血中を介しての腫瘍発生は報告されていない³⁹⁾。一方、DMHはDruckrey ら¹⁷⁾によってラット皮下に注射投与することにより、一部は血行性に、大部分は肝で代謝された後、胆汁を介して糞便中に排泄され直接大腸粘膜に作用し大腸癌を発生させるものとされている⁴⁰⁾⁴¹⁾。このように、これらの2種の発癌物質は投与経路、発癌の作用機序を全く異にするだけでなく、これらの発癌物質から誘発された大腸癌の病理組織学的検索でも両者は全く異なった所見を呈した。すなわち、腫瘍の発生部位はMNNGでの遠位大腸に対し、DMHでは近位大腸であり、さらにMNNGでは組織像のほとんどが高分化腺癌を示し、深達度も大半がsmまでにとどまったのに対し、DMHは粘液癌で進行癌が大半を占めた。しかしながら、MNNGおよびDMHで誘発された大腸癌担癌ラットの胆汁酸組成の変化がCA組成比の増加、末同定胆汁酸Xの減少、さらには1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値およびCA/DCA値の高値とほぼ同一の結果を示したことは、これらの胆汁酸組成の変化が大腸癌担癌個体に共通した所見と判断される。すなわち、かかる胆汁酸組成の変化は食餌性要因と関係なくMNNGおよびDMHで誘発された大腸癌発生に伴う胆汁酸代謝過程の変化を示唆するもので、大腸癌における内的環境の変化と推察される。

このような実験結果をふまえ、著者は臨床的に大腸癌担癌生体における胆嚢胆汁中胆汁酸組成を検索した。健康人の胆汁中胆汁酸組成比についてSjövall⁴²⁾はペーパークロマトグラフィー法の分析からCA41%、CDCA 37%、DCA 22%とし、また薄層・ガスクロマトグラフィー法を用いた岩渕⁴³⁾はCA 35.3±5.0%、CDCA 45.1±3.5%、DCA 18.0±7.0%と報告している。著者が対照とした胃潰瘍患者の胆汁酸組成比はCA 38.2±11.3%、CDCA 37.6±6.7%、DCA 16.8±

4.7%を示し、諸家の報告した健常人の組成比と差異はみられなかった。一方、大腸癌担癌生体ではCA 39.1±9.7%, CDCA 47.0±7.0%, DCA 7.9±3.9%を示し、2次胆汁酸であるDCA組成比の有意の低下が認められた。また、1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値は胃潰瘍患者の4.7±2.6に対し大腸癌患者では12.6±6.0であり、CA/DCA値も2.5±1.4に対し5.8±3.7%といずれも大腸癌患者で有意の高値を示した。この大腸癌患者における1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値およびCA/DCA値の高値は胆汁酸組成比で明らかのように2次胆汁酸、ことにDCAの減少に起因するものである。また、発癌リスクの高い家族性ポリポーシスや潰瘍性大腸炎患者でも胆汁中のDCA組成比が健常人に比し著明に低下していることが報告されている⁴³⁾。この胆汁中DCA組成比の減少が如何なる要因に起因するかは大腸内の内的環境を考察する上で極めて重要である。DCAの再吸収については、Miettinenら⁴⁴⁾の測定で、結腸直腸切除患者では胆汁中にDCAが存在しなかったこと、またSamuelら⁴⁵⁾の検討で、胆道手術患者の開腹時に大腸に注入された¹⁴C-CAの約60%に相当する放射活性のDCAがTチューブから出現したことなどから、DCAの再吸収は大腸に依存すること⁴⁶⁾は明確である。しかも、大腸癌患者では糞便中のステロイド核のdehydrogenationをおこしうる嫌気性菌*Clostridium paraputrificum*量が増加しているとの報告¹¹⁾⁴⁷⁾をあわせると、胆汁中DCAの減少は、大腸内細菌叢の変化に起因したCAからDCAへの変換障害によると考えるよりも、生成されたDCAが大腸粘膜から再吸収される過程での障害によると考える方が妥当である。すなわち、発癌物質でinitiateされた大腸粘膜動態の変化から2次胆汁酸の再吸収障害が惹起され、その結果担癌ラット胆汁中では2次胆汁酸とされる未同定胆汁酸Xの減少ならびにその代償作用として肝での合成促進に伴うCAの増加がみられ、一方担癌ヒト胆汁ではDCAの減少と、1次胆汁酸としてCAに代りCDCA量の増加がみられたものと推察される。大腸癌担癌ラットと担癌生体における胆汁中の各胆汁酸組成比にみられる若干の差異については、ヒトではLCのような胆汁酸を7 α 水酸化によってCDCAに転換することはできないのに対し、ラットでは転換可能とされ⁴⁸⁾、両者間の胆汁酸代謝過程の相違で説明される。しかし、全体的には1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値、CA/DCA値がともに全く同一の傾向を示しており、これらの胆汁酸組成が大腸癌担癌個体に共通した組成を呈していることを物語る。さて、DCAの再吸収障害は排泄面からすると便中への2次胆汁酸排泄量の増加を意味し、Beddyら⁴⁹⁾の大腸癌および腺腫性ポ

リープ患者では健常人に比し糞便中DCA、LCの排泄量が高値を示したとする報告と一致する。すなわち、大腸癌発生過程においてかかる胆汁酸組成の変化が重要な内的環境を形成している可能性を示唆する。

以上の結果をもとに、のような胆汁酸組成の変化が発癌過程のどの時期に発生するかを検索するため、著者はさらに発癌物質MNNGおよびDMH投与に伴う経時的な胆管胆汁中胆汁酸組成の推移を検討した。その結果、MNNG誘発大腸癌発生過程では、大腸粘膜に靡爛を認めたMNNG注腸直後から4週後までは、CDCA、DCA、UDCAの各胆汁酸組成比に変化をみなかったが、CA組成比は対照に対し、MNNG注腸直後群および4週後群では減少を示した。一方、16週後群では9匹中2匹に腺腫性ポリリープの発生を、40週後群では9匹中6匹に癌腫の発生をみたが、CA組成比は16週後群と40週後群で逆に有意の増加を示した。未同定胆汁酸Xについては対照に対し、MNNG注腸直後群および4週後群では増加を示すも、以後は16週後群と40週後群で逆に低下した。DMH誘発大腸癌発生過程では、CA組成比は対照に対し、DMH 200 mg/kg投与群、DMH 400 mg/kg投与群、DMH 400 mg/kg投与4週後群でDMH総投与量が200 mg/kgに達すると有意の増加を示し、以降は高値のまま推移した。未同定胆汁酸Xも対照に対し、いずれの群も低値を示し、DMH 200 mg/kg投与に達すると低値のまま推移した。1次胆汁酸量/2次胆汁酸量値は、MNNG誘発大腸癌発生過程では対照に対し、MNNG注腸直後群および4週後群で有意の低下を示したが、以後16週後群、40週後群で有意に上昇した。DMH誘発大腸癌発生過程でも対照に対し、DMH投与量が200 mg/kgに達した時点で高値を示し、そのまま推移した。さらに、CA/DCA値も、MNNG誘発大腸癌発生過程では対照に対し、直後群および4週後群で4週後までは低値を示したが、16週後群や40週後群では上昇を示した。DMN誘発大腸癌発生過程でも対照に対し、総投与量が200 mg/kgに達した後は有意に上昇した。このように、MNNG注腸およびDMH皮下注投与に伴う胆管内胆汁中胆汁酸組成は、MNNG注腸直後から4週後までの時期にみられたCA組成比の低下と未同定胆汁酸Xの増加を除くと、両者とも同様の組成比で推移した。MNNG注腸後4週までにみられた胆汁酸組成の変化に関しては、MNNG投与による大腸粘膜の中毒症状に起因するものと推察される。すなわち、経時的な内視鏡的観察によると、MNNG注腸後早期には大腸粘膜の混濁、発赤、靡爛、潰瘍、易出血性等の炎症所見が著明であったとの報告⁵⁰⁾がある。MNNGの早期中毒症状に基づく胆汁酸組成の変化は別として、腺

腫性ポリープが発生し始める MNNG 注腸後 16 週以降あるいは DMH 総投与量 200 mg/kg に達した後では、胆汁中胆汁酸組成は大腸癌担癌ラットの胆汁酸組成と同様の組成を呈することが判明した。また、この経時的な胆汁酸組成の推移から、MNNG や DMH などの発癌物質自体が胆汁酸組成の変化を惹起するものではなく、大腸粘膜に腺腫性ポリープなど大腸癌の前癌病変が形成される時期に一致して組成比が変化したことは極めて興味深い。

以上の結果を総括すると、大腸粘膜が日常の食生活において外来性に、あるいは食物中から大腸内で生成された N-ニトロソ化合物のごとき発癌物質にさらされ、癌発生に向って粘膜細胞動態の変化がすすむと、大腸内での 2 次胆汁酸である DCA などの再吸収障害が惹起され、元来閉鎖的な腸肝循環を営む胆汁酸代謝の変調をきたし、さらにこれが糞便中への DCA 排泄量の増加、あるいは排泄濃度の増大を招来し、大腸癌発生に対し促進的内的環境として作動するものと結論した。

結 論

大腸癌発生増殖過程における内的環境としての胆汁中胆汁酸組成の変化を検索するため、投与経路ならびに作用機序の異った 2 種の発癌物質 (MNNG および DMH) による大腸癌担癌ラットを作製し、その胆汁中胆汁酸組成を分析した。さらに、これらの発癌物質の投与後における経時的な胆汁酸組成の推移を病理組織学的所見と対比し検討した。また、臨床的に大腸癌患者における胆胆汁中胆汁酸組成についても検索し、以下の結果を得た。

1. MNNG 誘発大腸癌担癌ラットにおける胆汁中胆汁酸組成比は、対照とした生食注腸群に比し、DCA、CDCA、UDCA には差を認めなかったが、CA は担癌群で有意の高値 ($p < 0.01$) を示し、未同定胆汁酸 X は逆に低値 ($p < 0.01$) を示した。1 次胆汁酸量/2 次胆汁酸量値および CA/DCA 値は担癌群とともに有意の高値 ($p < 0.01$) を示した。

2. DMH 誘発大腸癌担癌ラットの胆汁中胆汁酸組成比については、CA は無処置群に比し担癌群で有意の高値 ($p < 0.01$) を示し、CDCA および未同定胆汁酸 X は逆に低値 ($p < 0.01$, $p < 0.01$) を示した。1 次胆汁酸量/2 次胆汁酸量値および CA/DCA 値は担癌群とともに有意の高値 ($p < 0.05$, $p < 0.05$) を示した。

3. MNNG 注腸投与後の経時的な胆汁酸組成比の推移については、CA は注腸後 4 週までは対照に比し有意の低値 ($p < 0.01$) を、注腸後 16 週以降では逆に

有意の高値を示した ($p < 0.01$)。未同定胆汁酸 X は注腸後 4 週までは有意の高値 ($p < 0.01$) を示すも、16 週以後では逆に有意の低値となった ($p < 0.01$)。1 次胆汁酸量/2 次胆汁酸量値は MNNG 注腸後 4 週までは減少 ($p < 0.05$) し、16 週以後では逆に増加した ($p < 0.01$)。CA/DCA 値も注腸後 4 週までは減少 ($p < 0.01$) し、16 週以後では増加した ($p < 0.01$)。

4. DMH 投与後の経時的な胆汁酸組成比の推移は DMH 総投与量が 200 mg/kg に達すると、CA は有意の高値 ($p < 0.01$) を示し、CDCA および未同定胆汁酸 X は逆に有意差をもって低値を示した ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。1 次胆汁酸量/2 次胆汁酸量値は対照に比し、DMH 総投与量 200 mg/kg 以上では高値 ($p < 0.01$) を示し、CA/DCA 値も同様に総投与量 200 mg/kg 以上では高値のまま推移した ($p < 0.01$)。

5. MNNG 誘発大腸癌はすべてラット遠位大腸に発生し、組織型は全例分化型腺癌を呈し、深達度も ss の 2 個を除き他の 8 個はすべて sm を示した。一方、DMH 誘発大腸癌は近位大腸に好発し、組織型は粘液癌が過半を占め、深達度も sm の 3 個を除き他は pm 以上の進行癌で、たがいに病理組織学的所見を異にした。

6. MNNG 注腸投与に伴う大腸粘膜の経時的変化は、MNNG 注腸 4 週後までは遠位大腸を中心に粘膜面の糜爛が観察されたが、腺腫性ポリープの出現は 16 週後で初めて認められ、腺癌は 40 週後で得られた。DMH 投与では総投与量 200 mg/kg で腺腫性ポリープの発生を認め、400 mg/kg で癌腫が観察され、さらに 4 週放置によって全例に癌腫の発生を認めた。

7. 大腸癌患者の胆胆汁中胆汁酸組成比については、DCA は胃潰瘍患者に対し大腸癌患者で有意の低値 ($p < 0.01$) を示し、CDCA は逆に有意の高値 ($p < 0.05$) を示した。なお、CA、LC、UDCA の各組成比には差異を認めなかった。1 次胆汁酸量/2 次胆汁酸量値および CA/DCA 値は大腸癌患者とともに有意の高値を示した ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

以上より、大腸癌担癌個体における胆汁中胆汁酸は一定の組成比を示すことが判明し、しかもこの変化が大腸粘膜に腺腫性ポリープの発生する時期と一致していたことから、発癌物質で initiate された大腸粘膜自体の変化が閉鎖的な胆汁酸代謝に影響を及ぼし、大腸癌発生増殖に対し促進的な内的環境を形成しているものと結論した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に衷心より感謝の意を捧げ

ます。また終始御助言、御支援をいただいた高島茂樹博士、ならびに御協力をいただいた教室員各位に深甚の謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第80回日本外科学会総会(1980年)、第22回日本消化器病学会(1980年)、第42回日本癌学会総会(1983年)において発表した。

文 献

- 1) Wynder, E. L. & Shigematsu, T.: Environmental factor of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, **20**, 1520-1561 (1967).
- 2) Doll, R.: The geographic distribution of cancer. *Br. J. Cancer*, **23**, 1-8 (1969).
- 3) Wynder, W. L. & Reddy, B. S.: The epidemiology of cancer of the large bowel. *Dig. Dis.*, **19**, 937-947 (1974).
- 4) Haenszel, W., Berg, J. W., Segi, M., Kurihara, M. & Locke, F. B.: Large bowel cancer in Hawaiian Japanese. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1765-1779 (1973).
- 5) 平山 雄: 大腸癌の疫学的変遷と今後の展望. *日本臨床*, **39**, 10-20 (1981).
- 6) Haubrich, W. S. & Berk, J. E.: Hereditary polyposis, p1078-1084. *In* H. L. Bochar (ed.), *Gastroenterology*, 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1976.
- 7) Sander, J. & Bürkle, G.: Induktion maligner Tumoren bei Ratten durch gleichzeitige Verfütterung von Nitrit und sekundären Aminen. *Krebsforsch*, **73**, 54-66 (1969).
- 8) Johnson, K. A.: The production of secondary amines by the human gut bacteria and its possible relevance to carcinogenesis. *Med. Lab. Sci.*, **34**, 131-143 (1977).
- 9) Antonis, A. & Bersohn, I.: The influence of diet on fecal lipids in South African white and Bantu prisoners. *Am. J. Clin. Nutr.*, **11**, 142-155 (1962).
- 10) Reddy, B. S. & Wynder, E. L.: Large bowel carcinogenesis: Fecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 1437-1442 (1973).
- 11) Hill, M. J., Crowther, J. S., Drasar, B. S., Hawksworth, G., Aries, V. & Williams, R. E. O.: Bacteria and etiology of cancer of large bowel. *Lancet*, **16**, 7690-7695 (1971).
- 12) Hill, M. J.: The role of colon anaerobes in the metabolism of bile acids and steroids, and its relation to colon cancer. *Cancer*, **36**, 2387-2400 (1975).
- 13) Narisawa, T., Sato, T., Hayakawa, M., Sakuma, A. & Nakao, H.: Carcinoma of the colon and rectum of rats by rectal infusion N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Gann*, **62**, 231-234 (1971).
- 14) 片山外一: 大腸癌発生増殖に及ぼす胆汁酸の影響に関する実験的研究. *十全医会誌*, **91**, 452-472 (1982).
- 15) Burkitt, D. P.: Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, **28**, 3-13 (1971).
- 16) 成沢富雄・添野武彦: 実験大腸癌. *日本臨床*, **30**, 446-449 (1972).
- 17) Druckrey, H., Preussmann, R., Matzkies, F. & Ivankovic, S.: Selektive Erzeugung von Darmkrebs bei Ratten durch 1,2-Dimethylhydrazin. *Naturwissenschaften*, **54**, 285-286 (1967).
- 18) 大腸癌研究会編: 大腸癌取り扱い規約, 第2版, 金原出版, 東京, 1980.
- 19) Wynder, E. L., Kajitani, T., Ishikawa, S., Doda, H. & Takano, A.: Environmental factors of cancer of the colon and rectum. II. Japanese epidemiological data. *Cancer Colon Rectum*, **23**, 1210-1220 (1969).
- 20) 成沢富雄: 大腸癌発生におけるプロモーターについて. *最新医学*, **37**, 1762-1765 (1982).
- 21) Hawksworth, G. M. & Hill, M. J.: Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines. *Br. J. Cancer*, **25**, 520-526 (1971).
- 22) Johnson, K. A.: The production of secondary amines by the human gut bacteria and its possible relevance to carcinogenesis. *Med. Lab. Sci.*, **34**, 131-143 (1977).
- 23) Varghese, A. J., Land, P. C. & Bruce, W. R.: Non-volatile N-nitroso compounds in human feces. *I. A. R. C. Sci. Publ.*, **19**, 257-64 (1978).
- 24) King-Thom Chung, Fulk, G. E. & Slein, M. W.: Tryptophanase of Fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 1073-1078 (1975).
- 25) Wynder, E. L.: The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res.*, **35**, 3388-3394 (1975).
- 26) Nigro, N. D., Singh, D. V., Campbell, R. L. & Pak, M. S.: Effect of dietary beef fat on intestinal tumor formation by Azoxymethane in rat. *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 439-442 (1975).
- 27) Reddy, B. S., Narisawa, T., Vukosich, D.,

- Weisburger, J. H. & Wynder, E. L.: Effect of quality and quantity of dietary fat and dimethylhydrazine in colon carcinogenesis in rats. *Pro. Soc. Exp. Bio. Med.*, **151**, 237-239 (1976).
- 28) 真下啓明・中川昌一・牧野 勲: 胆汁と胆汁酸. 代謝, **6**, 290-296 (1969).
- 29) 大管俊明・今井洋一・真重文子: 胆汁酸の腸管循環. 代謝, **13**, 臨増, 1275-1283 (1976).
- 30) Heaton, K. W. 胆汁酸, 146-148 頁, 文光堂, 東京, 1977.
- 31) Hill, M. J.: The effect of some factors on the fecal concentration of cid steroids, nentral steroids and urobilins. *J. Pathol.*, **104**, 239-245 (1971).
- 32) Hill, M. J.: Bacteria and the etiology of colonic cancer. *Cancer*, **34**, 815-818 (1974).
- 33) Reddy, B. S., Mastromarino, A. & Wynder, E. L.: Further leads on metabolic eqidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res.*, **35**, 3403-3406 (1975).
- 34) Reddy, B. S., Weisburger, J. H. & Wynder, E. L.: Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in man. *J. Nutr.* **105**, 878-884 (1975).
- 35) 金澤暁太郎・島田 馨: 大腸細菌叢. 総合臨床, **26**, 1042-1050 (1977).
- 36) 金澤暁太郎: 大腸癌と腸内細菌叢の変動. 最新医学, **33**, 2057-2061 (1978).
- 37) Mekhjian, H. S., Phillips, S. F. & Hofmann, A. F.: Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids: perfusion studies in man. *J. Clin. Invest.*, **50**, 1569-1577 (1971).
- 38) 成沢富雄: 実験大腸癌研究の概況: 医学のあゆみ, **103**, 203-208 (1977).
- 39) Nakano, H.: Histopathological studies on rat colorectal carcinoma induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Tohoku J. Exp. Med.*, **110**, 7-21 (1973).
- 40) Schauer, A., Vollnagel, T. H. & Wildanger, F.: Cancerisierung des Rattendarmes durch 1, 2-Dimethylhydrazin. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **150**, 87-93 (1969).
- 41) Wittig, Von G., Wildner, G. P., & Ziebarth, D.: Der Einfluss der Ingesta auf die kanzerisierung des Ratten darms durch Dimethylhydrazin. *Arch. Geschwulstforsch.*, **37**, 105-115 (1971).
- 42) Sjövall, J.: Bile acids inman under normal and pathological conditions, bile acids and steroids *73. Clin. Chim. Acta*, **5**, 33 (1960).
- 43) 岩淵仁寿: 各種消化管疾患における胆嚢胆汁の胆汁酸の組成. 日本消化器病学会雑誌, **75**, 869-880 (1979).
- 44) Miettinen, T. A. & Peltokallio, P.: Bile salt, fat, water and vitamin B₁₂ excretion after ileostomy. *Scand. J. Gastroent.*, **6**, 543-552 (1971).
- 45) Samuel, P., Saypol, G. M., Meilman, E., Mosbach, E. H. & Chafizadeh, M.: Absorption of bile acids from the large bowel in man. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2070-2078 (1968).
- 46) Percy-Robb, I. W., Jalan, K. N., McManus, J. P. A. & sircus, W.: Effect of ileal resection on bile salt metabolism in patients with ileostomy following proctocolectomy. *Clin. Sci.*, **41**, 371-382 (1971).
- 47) Hill, M. J., Drasar, B., Williams, R. E. O., Meade, T. W., Cox, A. G., Simpson, J. E. P. & Morson, B. C.: Fecal bile-acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet*, **8**, 535-538 (1975).
- 48) 牧野 勲・中川昌一: 胆汁酸, 10-22 頁, 中外医学社, 東京, 1980.
- 49) Reddy, B. S. & Wynder, E. L.: Metabolic epidemiology of colon cancer: Fecal bile acids and neutral steroids in colon cancer patients and patients with adenomatus polyps. *Cancer*, **39**, 2533-2539 (1977).
- 50) 金城福則: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) による実験的大腸隆起性病変の内視鏡学的研究. *Gastroenterological Endoscopy*, **22**, 193-207 (1980).

Effect of Acids as an Intrinsic Environment on Colon Carcinogenesis Kazutoshi Komori,
Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen
Med Soc., 94, 540—560 (1985)

Key words: colon carcinoma, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 1, 2-dimethylhydrazine,
bile acid

Abstract

The effect of bile acids on the development and proliferation of colon carcinoma was examined by analysing bile acid components in the bile of rats treated with two kinds of carcinogens, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and 1, 2-dimethylhydrazine (DMH), which differ in mechanism of action and route of administration. In addition, the bile acid components in the bile of patients with colon carcinomas were compared with those in patients with gastric ulcers. Similar significant changes in the bile acid components, namely, an elevation of cholic acid (CA), a decrease in unidentified bile acid (X), an elevation of primary bile acid volume/secondary bile acid volume ratio and elevation of cholic acid/deoxycholic acid (CA/DCA) ratio, were seen in rat with colon carcinomas induced by MNNG or DMH, while chenodeoxycholic acid (CDCA) was decreased in the DMH-treated groups. The bile acid in gallbladder bile of patients with colon carcinomas revealed elevations of CDCA, primary bile acid volume/secondary bile acid volume ratio and CA/DCA ratio, but a decrease in DCA. These changes in the components of bile acid were seen to correspond to the development of adenomatous polyps both in MNNG and DMH administration experiments, that is, around 16 weeks after intestinal infusions of MNNG or after a total dose of DMH injection reached over 200 mg/kg. These results indicated that patients with colon carcinomas exhibited a characteristic component ratio of bile acid in the bile and that this ratio was observed to correspond to the period of onset of tumorous changes in the colon epithelium induced by MNNG or DMH. These data further suggested that changes of colon epithelium initiated by a carcinogenic substance exerted an influence upon the metabolism of bile acid as an important factor in the development and proliferation of colon carcinoma.